

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> : <b>C07F 9/40, A61K 31/66, C07F 9/655, C12N 5/06</b>		<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/59916</b> (43) Date de publication internationale: 12 octobre 2000 (12.10.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00837 (22) Date de dépôt international: 4 avril 2000 (04.04.00) (30) Données relatives à la priorité: 99/04263 6 avril 1999 (06.04.99) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR). SANGSTAT MEDICAL CORPORATION [US/US]; 6300 Dubarton Circle, Fremont, CA 94555 (US). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BELMANT, Christian [FR/FR]; 16, rue Marcel Pagnol, F-31700 Blagnac (FR). BONNEVILLE, Marc [FR/FR]; 60, route de la Massonière, F-44120 Vertou (FR). PEYRAT, Marc, Alix [FR/FR]; 4, place des Libertés, F-44230 St. Sebastien (FR). FOURNIE, Jean-Jacques [FR/FR]; 8, Jardins de la Soulane, F-31450 Corronsac (FR). KOZIKOWSKI, Alan, P. [US/US]; 45 Cameron Court, Princetown, NJ 08540 (US). (74) Mandataire: CABINET BARRE LAFORGUE & ASSOCIES; 95, Rue des Amidonniers, F-31000 Toulouse (FR).		(81) Etats désignés: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(54) Title: COMPOUNDS SELECTIVELY INHIBITING GAMMA 9 DELTA 2 T LYMPHOCYTES (54) Titre: COMPOSES INHIBITANT SELECTIVEMENT LES LYMPHOCYTES T GAMMA 9 DELTA 2 (57) Abstract <p>The invention concerns compounds of formula <math>\text{CH}_3\text{-R}_1\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-R}_2</math> wherein: <math>\text{R}_1</math> is selected among a tertiary alcohol; a 1,2-diol; a halohydrine; an epoxide; an alkene; an aldehyde or an <math>\alpha</math>-hydroxyaldehyde; and <math>\text{R}_2</math> is selected among a methylenediphosphonate; a difluoromethylenediphosphonate; or a monofluoromethylenediphosphonate. The invention also concerns the uses of said compounds as selective inhibitors of <math>\text{T}\gamma 9\delta 2</math> lymphocytes, and their uses, in particular for therapeutic purposes.</p> (57) Abrégé <p>Composés de formule: <math>\text{CH}_3\text{-R}_1\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-R}_2</math>, ou <math>\text{R}_1</math> est choisi parmi: un alcool tertiaire; un 1, 2-diol; un halohydrine; un époxyde; un alcène; un aldéhyde ou un <math>\alpha</math>-hydroxyaldéhyde; et <math>\text{R}_2</math> est choisi parmi: un méthylènediphosphonate; un difluorométhylènediphosphonate, ou un monofluorométhylènediphosphonate. L'invention concerne les utilisations de ces composés comme agents d'inhibition sélective des lymphocytes <math>\text{T}\gamma 9\delta 2</math>, et leurs applications, notamment à titre thérapeutique.</p>			

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## COMPOSES INHIBITANT SELECTIVEMENT LES LYMPHOCYTES T GAMMA 9 DELTA 2

L'invention concerne des composés inhibant sélectivement les  
5 lymphocytes  $T\gamma\delta$  porteurs de récepteurs à régions variables  $V\gamma 9$  et  $V\delta 2$ .

Les lymphocytes  $T\gamma\delta$  des primates présents dans le sang  
périphérique (humains, singes) représentent, chez l'individu sain, habituellement de  
1 à 5% des lymphocytes du sang et jouent un rôle dans le système immunitaire. Il a  
été démontré qu'ils reconnaissent leurs ligands antigéniques par une interaction  
10 directe avec l'antigène, sans présentation par les molécules du CMH d'une cellule  
présentatrice. Les lymphocytes  $T\gamma\delta$  (parfois aussi désignés lymphocytes  $T\gamma 2\delta 2$ )  
sont des lymphocytes  $T\gamma\delta$  porteurs de récepteurs TCR à régions variables  $V\gamma 9$  et  
 $V\delta 2$ . Ils représentent la majorité des lymphocytes  $T\gamma\delta$  dans le sang humain.

Lorsqu'ils sont activés, les lymphocytes  $T\gamma\delta$  exercent une  
15 puissante activité cytotoxique non restreinte par le CMH, particulièrement efficace  
pour tuer divers types de cellules, notamment des cellules pathogènes. Néanmoins,  
l'activation massive des lymphocytes  $T\gamma\delta$  accompagnant parfois le développement  
de certaines pathologies peut présenter ou induire un caractère pathogène. Tel est le  
cas en particulier des maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques  
20 (Wucherpfennig K. *et al* " $\gamma\delta$ T cell receptor repertoire in acute multiple sclerosis  
lesion" 1992, PNAS 89, 4588) ou la maladie de Behçet (Yamashita N. *et al* "Role  
of  $\gamma\delta$ T lymphocytes in the development of Behçet disease" Clinical Experimental,  
Immunology, 107(2), 241-247).

Tel est la cas en outre d'un certain nombre de pathologies  
25 bactériennes telles que la brucellose, la tularémie, les salmonelloses, les  
tuberculoses, l'ehrlichiose, ou parasitaires telles que la malaria (accès de  
paludisme), la leishmaniose viscérale, la toxoplasmose (par exemple Morita C.T. *et al*,  
"Direct presentation of non peptide prenyl pyrophosphate antigens to human  
gamma delta T cells", 1996, Research in Immunology, Vol. 147, p 347-353).

30 Divers antigènes des lymphocytes  $T\gamma\delta$  ont été décrits (WO-  
9520673, US-5639653, "Natural and synthetic non peptide antigens recognized by

human  $\gamma\delta$ T cells", Yoshimasa Tanaka *et al*, Nature, 375, 1995, pp 155-158). Néanmoins, ces antigènes naturels ne sont pas complètement identifiés. En outre, on sait que le mécanisme de l'activation des lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2 par ces antigènes est particulier puisqu'il n'implique aucune molécule connue du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité). Mais, la nature de ce mécanisme reste inexpliquée, de sorte  
5 que le problème de la mise au point d'inhibiteurs des lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2 reste posé.

WO-9520673 indique aussi que les principes présentant une activité enzymatique phosphatase (monostér phosphorique phosphohydrolase et/ou nucléotide pyrophosphatase et/ou diestér phosphorique phosphohydrolase) tels que  
10 la phosphatase alcaline, sont susceptibles d'inhiber l'activité d'antigènes d'origine naturelle, dits TUBag, issus d'un extrait mycobactérien, vis-à-vis des lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2. Néanmoins, cette inhibition intervient par clivage des antigènes et n'agit donc pas sur les lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2 eux-mêmes. En outre, elle est non spécifique et pose des problèmes d'effets secondaires incontrôlables dans la mesure où les  
15 milieux biologiques ou physiologiques comprennent eux-mêmes de nombreux composés phosphorylés et des activités enzymatiques phosphatases naturelles.

L'invention vise donc à proposer des composés d'inhibition sélective de la stimulation lymphocytaire T $\gamma$ 9 $\delta$ 2, c'est-à-dire des composés immunosupresseurs spécifiques des lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2.

20 L'invention vise plus particulièrement à proposer de tels composés qui soient compatibles, d'une part, avec une administration à un primate, et, d'autre part, avec les contraintes de rentabilité d'une exploitation industrielle (qui puissent être fabriqués de façon simple, en grandes quantités, à un coût acceptable à l'échelle industrielle).

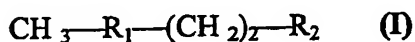
25 Par ailleurs, il est aussi souhaitable que l'inhibition des lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2 pour le traitement d'un excès d'activation de ces lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2 ne détruise pas définitivement le système immunitaire du patient ou du milieu biologique lymphocytaire. Ainsi, l'invention vise aussi à proposer des composés ayant une activité d'inhibition qui soit non seulement sélective à l'égard  
30 des lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2, mais également réversible, de sorte que l'activité des lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2 puisse ultérieurement être restaurée.

L'invention vise également à proposer de nouveaux composés phosphorés et leur procédé de fabrication.

L'invention vise aussi à proposer des applications des composés selon l'invention pour l'inhibition sélective et réversible des lymphocytes Ty982. Plus particulièrement l'invention vise à proposer des applications des composés selon l'invention à titre thérapeutique, des applications des composés selon l'invention pour le diagnostic, et des applications des composés selon l'invention pour l'étude expérimentale des lymphocytes Ty982, de leurs antigènes ou agents immunosuppresseurs spécifiques.

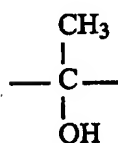
L'invention vise en particulier à proposer un traitement des pathologies impliquant une activation des lymphocytes Ty982, et notamment choisie parmi la malaria (accès de paludisme), la leishmaniose viscérale, la toxoplasmose, la brucellose, la tularémie, les salmonelloses, les tuberculoses, l'ehrlichiose, les maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques ou la maladie de Behçet.

Pour ce faire, l'invention concerne des nouveaux composés de formule :

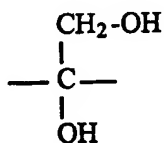


où R<sub>1</sub> est choisi parmi les fonctions suivantes :

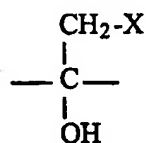
20



alcool tertiaire

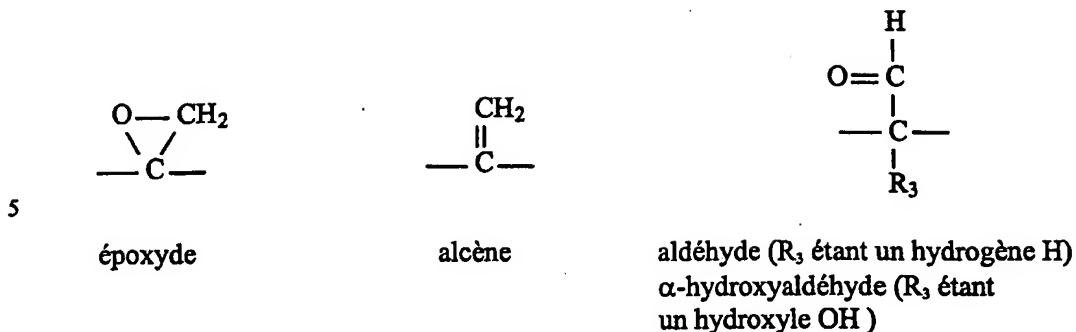


1,2-diol

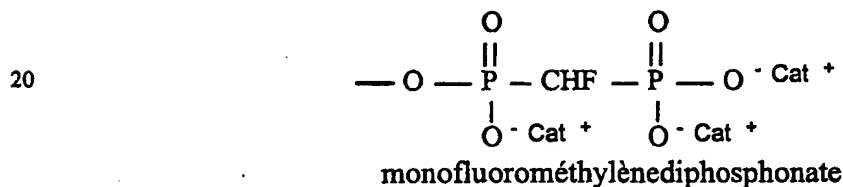
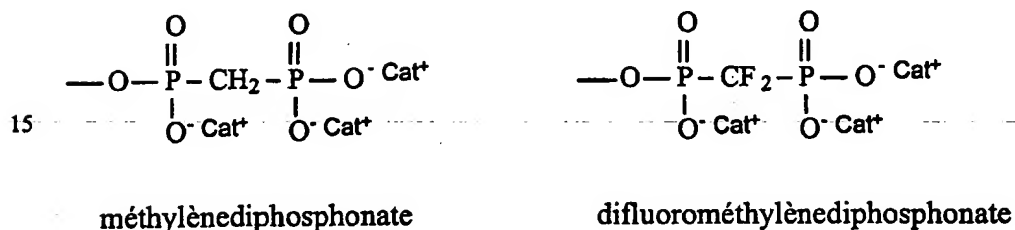


halohydrine, X étant un halogène choisi parmi Cl, Br, I

25



10 et R<sub>2</sub> est choisi parmi l'un des groupements suivants :



où Cat<sup>+</sup> représente un (ou des) cation(s) organique(s) ou minéral(aux) (y compris le proton) identiques ou différents dans le même composé,

25 à l'exception du 3-méthyl-3-butène-1-yl-difluorométhylènediphosphonate, et du 3-méthyl-3-butène-1-yl-méthylènediphosphonate.

Les composés conformes à la formule (I) de l'invention sont les suivants (nomenclature IUPAC) :

R<sub>1</sub> : fonction alcool tertiaire :

30

3-méthyl-3-butanol-1-yl-méthylènediphosphonate ;  
3-méthyl-3-butanol-1-yl-monofluorométhylènediphosphonate ;  
3-méthyl-3-butanol-1-yl-difluorométhylènediphosphonate ;

R<sub>1</sub> : fonction 1,2-diol :

3-méthyl-3,4-butanediol-1-yl-méthylènediphosphonate ;  
35 3-méthyl-3,4-butanediol-1-yl-monofluorométhylènediphosphonate ;

3-méthyl-3,4-butanediol-1-yl-difluorométhylènediphosphate.

$R_1$  : fonction halohydrine avec  $X = Cl, Br, I$  :

3-(chlorométhyl)-3-butanol-1-yl-méthylènediphosphate ;

3-(chlorométhyl)-3-butanol-1-yl-monofluorométhylènediphosphate;

5 3-(chlorométhyl)-3-butanol-1-yl-difluorométhylènediphosphate;

3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-méthylène-diphosphate ;

3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-monofluorométhylènediphosphate;

3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-difluorométhylène-diphosphate ;

3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl-monofluorométhylènediphosphate ;

10 3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl-méthylènediphosphate ;

3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl-difluoro-méthylènediphosphate.

$R_1$  : fonction époxyde :

3,4-époxy-3-méthyl-1-butyl-méthylènediphosphate ;

3,4-époxy-3-méthyl-1-butyl-monofluorométhylènediphosphate ;

15 3,4-époxy-3-méthyl-1-butyl-difluorométhylènediphosphate.

$R_1$  : fonction alcène :

3-méthyl-3-butène-1-yl-méthylènediphosphate ;

3-méthyl-3-butène-1-yl-monofluorométhylènediphosphate ;

3-méthyl-3-butène-1-yl-difluorométhylènediphosphate.

20  $R_1$  : fonction aldéhyde ( $R_3 = H$ ) :

3-formyl-1-butyl-méthylènediphosphate ;

3-formyl-1-butyl-monofluorométhylènediphosphate ;

3-formyl-1-butyl-difluorométhylènediphosphate.

$R_1$  : fonction  $\alpha$ -hydroxyaldéhyde ( $R_3 = OH$ ) :

25 3-formyl-3-butanol-1-yl-méthylènediphosphate ;

3-formyl-3-butanol-1-yl-monofluorométhylènediphosphate ;

3-formyl-3-butanol-1-yl-difluorométhylènediphosphate.

Le 3-méthyl-3-butène-1-yl-difluorométhylènediphosphate a  
été décrit par "phosphorylation of isoprenoid alcohols" V. Jo Davisson *et al.*, J. Org.  
30 Chem. 1986, 51, 4775.

L'invention concerne en outre les composés de formule (I) ci-dessus (y compris le 3-méthyl-3-butène-1-yl-difluorométhylènediphosphonate) pour leurs utilisations comme agents d'inhibition sélective des lymphocytes Ty9δ2.

L'invention concerne plus particulièrement les composés de  
5 formule (I) ci-dessus pour leurs utilisations comme agents d'inhibition de l'activation sélective phosphoantigénique des lymphocytes Ty9δ2 par un agent antigène phosphaté (phosphoantigène), tel qu'un antigène naturel (par exemple les Tubag décrits par WO-9520673), ou artificiel tel que l'IPP (3-méthyl-3-butène-1-yl-pyrophosphate), un composé phosphohalohydrine tel que BrHPP (3-(bromométhyl)-  
10 3-butanol-1-yl-diphosphate) ou IHPP (3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl-diphosphate), ou un composé phosphoépoxyde tel que EpoxPP (3,4 époxy-3-méthyl-1-butyl-diphosphate).

Bien que le mécanisme réel de l'inhibition des lymphocytes Ty9δ2 par les composés de l'invention ne soit pas définitivement élucidé, les  
15 travaux des inventeurs permettent de penser qu'une telle inhibition sélective des lymphocytes Ty9δ2 peut être obtenue par des composés qui satisfont les trois conditions suivantes :

- 1) présenter une molécule de forme topologique correspondant à la formule (I),
- 20 2) présenter une fonction R<sub>1</sub> susceptible de former une liaison covalente suite à une réaction du type substitution ou addition nucléophile, ou addition électrophile en présence des lymphocytes Ty9δ2,
- 3) présenter un groupement analogue structural d'un pyrophosphate, mais susceptible d'inhiber l'hydrolyse enzymatique du phosphate  
25 terminal nécessaire à l'activation des lymphocytes Ty9δ2.

Un tel composé peut en effet avoir la propriété d'occuper les sites de reconnaissance antigénique des récepteurs Vγ9 Vδ2 grâce aux conditions 1) et 2), mais d'empêcher la transduction du signal d'activation au lymphocyte du fait que l'hydrolyse enzymatique du phosphate terminal, dont les inventeurs pensent  
30 qu'elle serait nécessaire à cette transduction, est inhibée.



La fonction  $R_1$  est choisie de façon à être compatible avec les conditions 1) et 2) ci-dessus et pour permettre l'obtention du composé selon l'invention. Le groupement  $CH_3-R_1-(CH_2)_2-$  doit ainsi être un ligand antigénique du récepteur T V $\gamma$ 9 V $\delta$ 2. Il peut s'agir de l'isopentényl, bien connu, qui est un ligand antigénique. Les inventeurs ont démontré en outre que les autres groupements  $CH_3-R_1-(CH_2)_2-$  de la formule (I) mentionnés ci-dessus permettent aussi d'obtenir des inhibiteurs des lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2.

Le groupement  $R_2$  est choisi parmi les analogues structuraux des pyrophosphates non hydrolysables ou faiblement hydrolysables. De tels analogues des pyrophosphates sont connus en eux-mêmes (cf. "ATP analogs" par R.G. Yount (1975) Adv. Enzymol. Vol. 43, p 1-56 ; « Synthesis of monofluoro- and difluoro- methylenephosphonate analogues of *sn*-glycerol-3-phosphate as substrates for glycerol-3-phosphate dehydrogenase and the X-Ray structure of the fluorométhylenephosphonate moiety » par J. Nieschalk et al. (1996) Tetrahedron vol. 52 p165-176 ; "The difluoromethylenephosphonate moiety as a phosphate mimic : X ray structure of 2 amino-1,1-difluoro ethylphosphonic acid" par R.D. Chambers et al. (1990) J. Chem. Soc. Chem. Commun. vol. 15, p 1053-1054).

Il convient en outre de choisir un groupement  $R_2$  compatible avec la synthèse du composé selon l'invention.

L'invention s'étend également aux utilisations des composés selon l'invention à titre d'inhibiteurs des lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2 des primates, notamment à titre d'inhibiteur de la prolifération et/ou de l'activité cytotoxique et/ou de la production de substance(s) médiatrice(s) par les lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2 des primates à récepteurs TCR comprenant les régions variables V $\gamma$ 9 et V $\delta$ 2.

L'invention s'étend aussi aux applications des composés selon l'invention pour le traitement de cellules sensibles aux lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2 des primates, dans un milieu naturel ou artificiel susceptible de contenir des lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2, dans lequel lesdites cellules peuvent être mises en contact avec ces lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2, ce milieu étant compatible avec les composés selon l'invention (c'est-à-dire n'est pas susceptible d'en provoquer la dégradation au moins dans certaines conditions du traitement).

Par "cellule sensible aux lymphocytes Ty982", on entend toute cellule sujette à l'activité effectrice induite des lymphocytes Ty982 (mort cellulaire, l'invention permettant d'empêcher la destruction de ces cellules par les lymphocytes) ; réception de médiateurs relargués par les lymphocytes Ty982 (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ...) ; prolifération cellulaire induite par les lymphocytes Ty982.

L'invention s'étend donc à un procédé d'inhibition sélective des lymphocytes Ty982 -notamment à un procédé d'inhibition sélective de la prolifération des lymphocytes Ty982 et/ou de l'activité cytotoxique des lymphocytes Ty982 et/ou de la production de substance(s) médiatrice(s) par les lymphocytes Ty982- dans lequel on met ces lymphocytes Ty982 au contact d'au moins un composé selon l'invention dans un milieu contenant des lymphocytes Ty982.

Avantageusement et selon l'invention, on utilise au moins un composé selon l'invention à une concentration dans le milieu qui procure une inhibition sélective de la prolifération polyclonale des lymphocytes Ty982. Ce milieu peut être choisi parmi le sang humain, le sang d'un primate non humain, les extraits de sang humain, et les extraits de sang d'un primate non humain.

Avantageusement et selon l'invention, on utilise une concentration supérieure à la concentration IC50 du composé selon l'invention, définie comme celle permettant de réduire de 50% l'intensité de la réponse des lymphocytes Ty982, selon le test de cytotoxicité induite, à un stimulant antigénique étalon, notamment le BrHPP à 80nM.

Ledit milieu peut être extracorporel, ledit procédé d'inhibition selon l'invention étant alors un traitement extracorporel, pouvant notamment servir en laboratoire, par exemple pour le diagnostic ou l'étude des lymphocytes Ty982 ou de leurs propriétés. Pour le diagnostic, l'inhibition des lymphocytes Ty982 peut servir à évaluer l'état d'activation des lymphocytes Ty982 prélevés sur un patient, selon leur comportement après mise au contact d'une quantité inhibitrice d'un composé selon l'invention.

Ledit milieu peut être aussi intracorporel, l'inhibition sélective des lymphocytes Ty982 ayant alors une utilité thérapeutique ou de diagnostic.

Plus particulièrement, ledit milieu est le sang périphérique d'un primate. L'invention s'étend donc en particulier à un procédé d'inhibition sélective des lymphocytes  $T\gamma 9\delta 2$  du sang périphérique d'un primate -notamment de l'homme- dans lequel on administre une quantité apte à inhiber les lymphocytes  $T\gamma 9\delta 2$  d'au moins un composé selon l'invention. On administre donc au moins un composé selon l'invention par voie générale -notamment parentérale dans le sang périphérique-.

Ledit milieu peut aussi être un site cellulaire à traiter, et on administre au moins un composé selon l'invention directement au contact du site cellulaire à traiter (administration topique).

Ainsi, l'invention s'étend aux applications des composés selon l'invention à titre thérapeutique pour le traitement curatif ou préventif des pathologies induisant une activation des lymphocytes  $T\gamma 9\delta 2$  des primates dans un milieu pouvant contenir ces lymphocytes  $T\gamma 9\delta 2$ .

L'invention concerne donc aussi les composés de la formule (I) pour leur utilisation à titre de substances thérapeutiquement actives chez les primates. L'invention concerne aussi l'application des composés selon la formule (I), pour leur utilisation dans une composition thérapeutique destinée à être administrée à un primate en vue du traitement préventif ou curatif d'une pathologie impliquant l'activation des lymphocytes  $T\gamma 9\delta 2$ .

L'invention s'étend en particulier aux applications thérapeutiques des composés selon l'invention pour le traitement des pathologies des primates appartenant au groupe formé des parasitoses choisies parmi la malaria (paludisme), la leishmaniose viscérale et la toxoplasmose ; des maladies auto-immunes -notamment la sclérose en plaques et la maladie de Behçet- induisant une activation des lymphocytes  $T\gamma 9\delta 2$  ; des pathologies bactériennes choisies parmi la brucellose, la tularémie, les salmonelloses, les tuberculoses, et l'ehrlichiose. Selon l'invention, on administre une composition thérapeutique adaptée pour libérer dans le sang périphérique et/ou sur un site cellulaire à traiter une quantité d'au moins un composé selon l'invention apte à inhiber les lymphocytes  $T\gamma 9\delta 2$ .

En effet, il a été démontré de façon générale dans l'art antérieur sus-cité qu'une composition ayant la propriété d'inhiber les lymphocytes Ty982 peut être avantageusement utilisée pour le traitement de ces pathologies.

De façon traditionnelle, dans tout le texte, les termes "thérapie" ou "thérapeutique" englobent non seulement les traitements curatifs ou les soins, mais également les traitements préventifs (prophylaxie) tels que la vaccination. En effet, en permettant l'inhibition sélective des lymphocytes Ty982, l'invention permet des traitements d'immunostimulation pouvant être avantageux aussi bien à titre prophylactique en empêchant le développement des lymphocytes Ty982, qu'à titre curatif en inhibant les lymphocytes Ty982.

L'invention s'étend donc aussi à une composition thérapeutique ou de diagnostic comprenant au moins un composé selon l'invention. Plus particulièrement, l'invention concerne une composition thérapeutique comprenant une quantité apte à être administrée à un primate -notamment au contact du sang périphérique ou par voie topique d'au moins un composé selon l'invention -notamment pour le traitement préventif ou curatif des pathologies suscitées-. Une composition selon l'invention peut être une composition immunostimulante, ou un vaccin, les composés selon l'invention étant des antigènes inhibant sélectivement les lymphocytes Ty982.

Une composition thérapeutique selon l'invention peut être préparée sous une forme galénique apte à être administrée par voie générale, notamment par voie parentérale directement dans le sang périphérique d'un primate, avec au moins un composé selon l'invention en quantité adaptée pour inhiber les lymphocytes Ty982 et un ou plusieurs excipient(s) approprié(s). Compte tenu de la concentration active des composés selon l'invention (de l'ordre de 10 à 1000  $\mu\text{M}$ ), une telle administration est envisageable sans risque de toxicité.

Une composition thérapeutique selon l'invention peut aussi être préparée sous une forme galénique appropriée pour son administration topique, directement au contact des lymphocytes Ty982.

La forme galénique d'une composition thérapeutique selon l'invention est réalisée selon la voie d'administration choisie, par les techniques

traditionnelles de formulation galénique. La quantité et la concentration de composé(s) selon l'invention, et la posologie sont déterminées par référence aux traitements chimiothérapeutiques connus des maladies à traiter, compte tenu de la bioactivité des composés selon l'invention vis-à-vis des lymphocytes Ty982, de l'individu à traiter, de la maladie concernée et des effets biologiques recherchés.

Avantageusement et selon l'invention, on administre le composé selon l'invention selon une quantité apte à créer dans le sang périphérique du patient une concentration supérieure à la concentration IC50 du composé selon l'invention telle que définie ci-dessus.

Avantageusement et selon l'invention, pour un composé bioactif à une concentration comprise entre 1  $\mu$ M et 1000  $\mu$ M, on administre par voie générale une quantité de composé(s) selon l'invention comprise entre 0,1mg et 1g - notamment entre 1mg et 100mg- par kilogramme de poids du patient.

Par ailleurs, il a été démontré in vitro que les composés selon l'invention ne présentent aucune toxicité générale. En outre, on sait que la catégorie biochimique de molécules à laquelle les composés selon l'invention appartiennent (phosphoesters) constitue une famille de composés compatibles avec les milieux biologiques analogues et physiologiques. Les composés selon l'invention ne présentent donc pas d'autres effets toxiques que ceux induits par leur bioactivité sur les lymphocytes Ty982.

En outre, les composés selon l'invention présentent un poids moléculaire suffisamment faible (notamment inférieur à 500) pour être compatible avec leur élimination par voie rénale et urinaire.

Un exemple de formulation de composition thérapeutique injectable selon l'invention pour un primate de 1kg est le suivant :

5 mg de sels de sodium du 3,4-époxy-3-méthyl-1-butyl-méthylènediphosphonate (Epoxy-PCP) dilués dans 5 ml de tampon Ringer -Lactate stérile .

On administre ainsi pendant 4 jours : 1 dose par jour de 5 mg pour 1kg d'animal, correspondant à une concentration dans le sang circulant de 50 mg/l, adaptée pour être supérieure à la concentration IC50 de 15  $\mu$ M pour l' Epoxy-PCP (une concentration de 50mg/l correspondant à environ 160  $\mu$ M).

Il est à noter que la majorité des excipients ou autres additifs pharmaceutiquement acceptables traditionnellement utilisés, sont chimiquement compatibles avec les composés selon l'invention.

Une composition thérapeutique selon l'invention peut aussi  
5 avantageusement comprendre un ou plusieurs autre(s) principe(s) actif(s), notamment pour procurer un effet synergique. En particulier, un composé selon l'invention peut faire office d'adjuvant de vaccin. La composition thérapeutique vaccinnante selon l'invention est alors formée d'une composition vaccinnante connue à laquelle on rajoute une quantité de composé(s) selon l'invention apte à inhiber les  
10 lymphocytes Ty9δ2 qui ne pourront exercer ni leur activité effectrice directe (par exemple cytotoxique), ni régulatrice de type Th-1 (par exemple relargage d'interféron et de facteur de nécrose tumorale (TNF ou "tumor necrosis factor")), et favorisent ainsi les réponses des lymphocytes B (par exemple production d'anticorps).

15 L'invention s'étend aussi à l'utilisation d'au moins un composé selon l'invention pour la fabrication d'une composition thérapeutique selon l'invention. Plus particulièrement, l'invention porte sur l'utilisation d'au moins un composé selon l'invention pour la fabrication d'une composition thérapeutique destinée au traitement préventif ou curatif d'une pathologie induisant une activation  
20 des lymphocytes Ty9δ2 des primates -notamment une pathologie sélectionnée dans le groupe mentionné ci-dessus-. A ce titre, l'invention s'étend aussi à l'utilisation d'au moins un composé selon l'invention pour la fabrication d'une composition thérapeutique destinée à être administrée -notamment au contact du sang périphérique ou par voie topique- à un primate -notamment à l'homme- pour le  
25 traitement préventif ou curatif d'une pathologie telle que mentionnée ci-dessus.

L'invention s'étend aussi à un procédé de fabrication d'une composition -notamment une composition thérapeutique- selon l'invention ayant la propriété d'inhiber sélectivement les lymphocytes Ty9δ2, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'invention. L'invention porte aussi sur un procédé de  
30 fabrication d'une composition thérapeutique destinée au traitement préventif ou curatif d'une pathologie telle que mentionné ci-dessus, dans lequel on utilise au

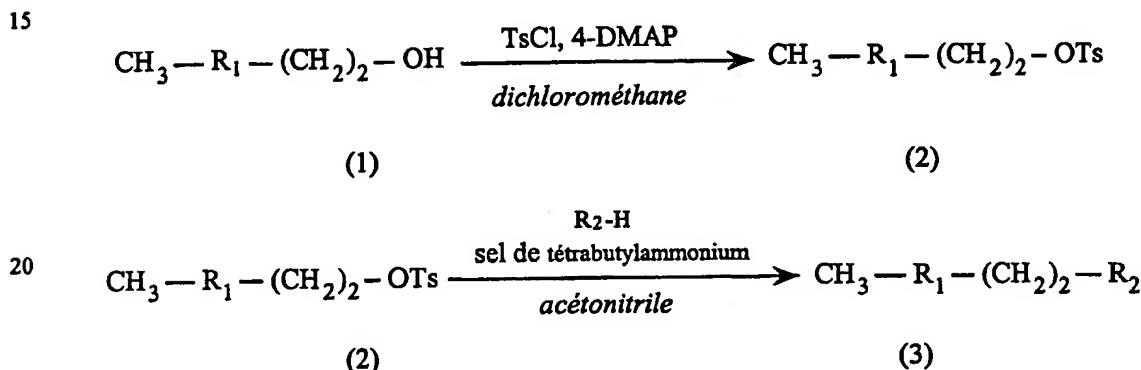
moins un composé selon l'invention. L'invention porte en particulier sur un procédé de fabrication d'une composition thérapeutique destinée à être administrée - notamment au contact du sang périphérique ou par voie topique- à un primate pour le traitement préventif ou curatif d'une pathologie telle que mentionnée ci-dessus, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'invention.

Les composés selon l'invention peuvent être préparés selon les schémas réactionnels donnés ci-après, selon les différents groupements R1 et R2.

Dans ces schémas, PCP identifie le groupement méthylènediphosphonate, PCHFP identifie le groupement monofluorométhylènediphosphonate, et PCF<sub>2</sub>P identifie le groupement difluorométhylènediphosphonate.

#### Schéma I :

Pour R<sub>1</sub> : fonction alcool tertiaire, alcène, époxyde, et R<sub>2</sub> : PCP, PCHFP, PCF<sub>2</sub>P :



où Ts est le tosyle, TsCl est le chlorure de tosyle, 4-DMAP est la 4-diméthylaminopyridine.

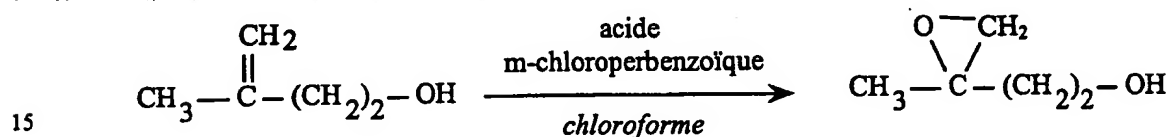
Les sels de tétrabutylammonium du réactif R<sub>2</sub>-H, utilisés en quantité au moins égale à 2 équivalents molaires sont, selon le groupement R<sub>2</sub> du composé à préparer :

- pour PCP : le tris(tétra-n-butylammonium) hydrogénométhylène-diphosphonate préparé à partir d'acide méthylène diphosphonique,
- pour PCF<sub>2</sub>P : le tris(tétra-n-butylammonium) hydrogéné-difluorométhylène-diphosphonate préparé à partir de tétrakis(triméthylsilyl)-

difluorométhylènediphosphonate selon la procédure décrite par V. Jo DAVISSON *et al.* J. Org. Chem., 51, p 4768-4779, (1986),

- pour PCHFP : le tris(tétra-n-butylammonium) hydrogénomono-  
monofluorométhylènediphosphonate préparé à partir de tétrakis(triméthylsilyl)-  
monofluorométhylènediphosphonate selon la procédure décrite par J. NIESCHALK  
5 *et al.* (1996) Tetrahedron vol. 52 p165-176 et adaptée selon V. Jo DAVISSON *et al.*  
J. Org. Chem., 51, p 4768-4779, (1986).

Les alcools (1) sont des produits commercialement  
disponibles à l'exception de l'alcool correspondant à la fonction R1 époxyde qui  
10 peut être obtenu facilement (G. M. RUBOTTOM *et al.*, Org. Synth. Coll. Vol 7, p  
282 (1990), Wiley) par époxydation de la fonction alcène selon :

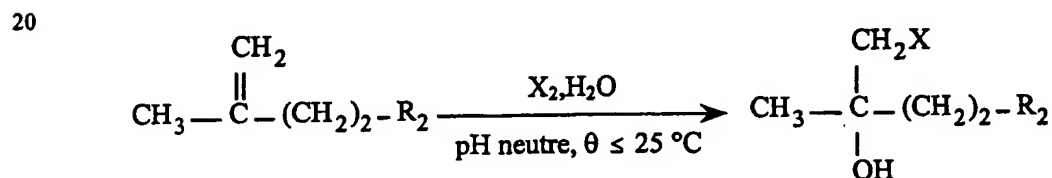


(1) avec R<sub>1</sub> : fonction alcène

(1) avec R<sub>1</sub> : fonction époxyde

### Schéma II :

Pour R<sub>1</sub> : fonction Halohydrine (X = Cl, Br, I), et R<sub>2</sub> : PCP, PCHFP, PCF<sub>2</sub>P :

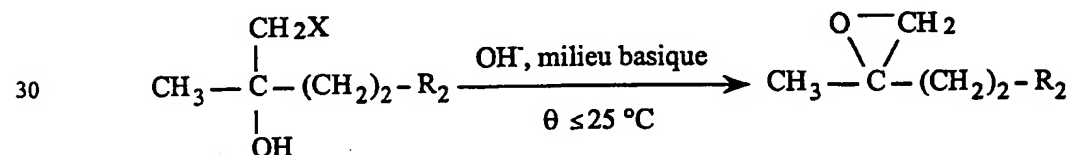


25 (3) avec R<sub>1</sub> : fonction alcène

(5)

### Schéma III :

Variante pour R<sub>1</sub> : fonction époxyde, et R<sub>2</sub> : PCP, PCHFP, PCF<sub>2</sub>P :



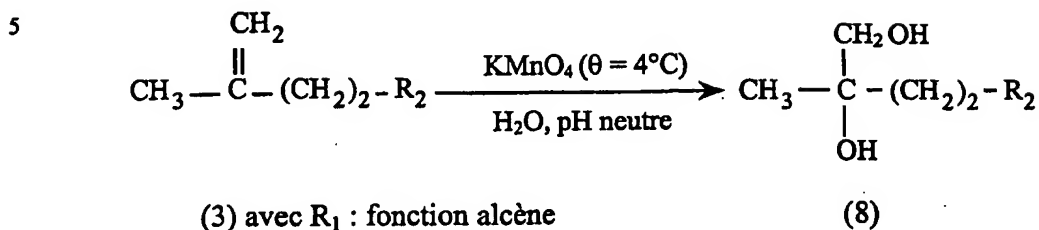
(5)

(6)



Schéma IV :

Pour  $R_1$  : fonction 1,2-diol, et  $R_2$  : PCP, PCHFP, PCF<sub>2</sub>P :

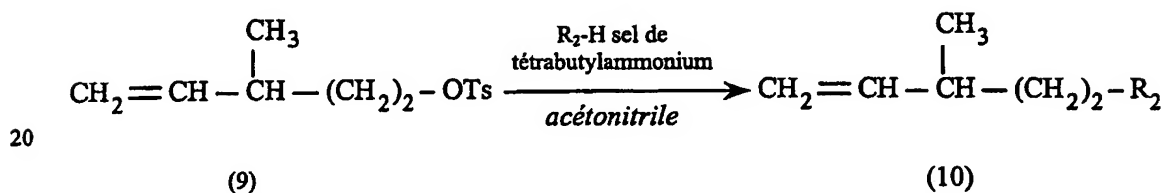


10

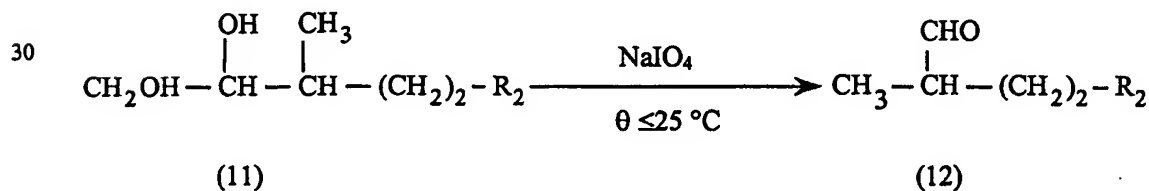
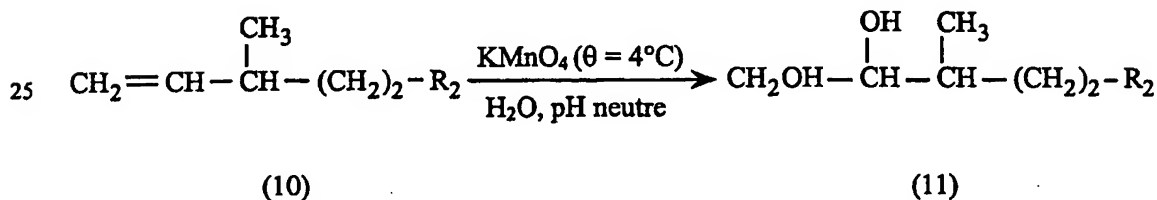
où  $\text{KMnO}_4$  est le permanganate de potassium (en quantité inférieure ou égale à 1 équivalent molaire)

Schéma V :

15 Pour  $R_1$  : fonction aldéhyde, et  $R_2$  : PCP, PCHFP, PCF<sub>2</sub>P :



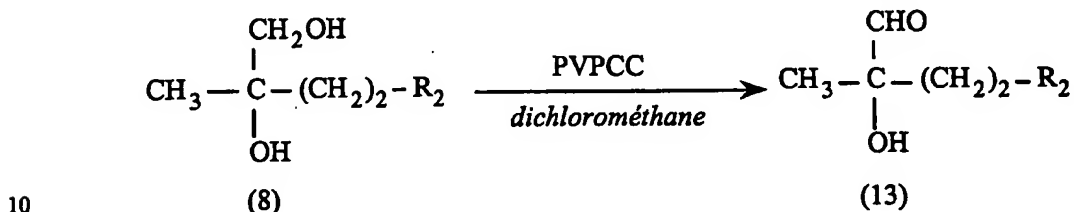
où  $\text{R}_2\text{-H}$  est utilisé en quantité au moins égale à 2 équivalents molaires.



Le composé (9) peut être obtenu aisément sous forme alcool par synthèse de Grignard entre un organomagnésium d'alcényle et le formaldéhyde ou l'oxyde d'éthylène, par exemple en partant du 1-chloro-2-méthyl-3-butène.

Schéma VI :

5 Pour  $R_1$  : fonction  $\alpha$ -hydroxyaldéhyde, et  $R_2$  : PCP, PCHFP, PCF<sub>2</sub>P :



où PVPCC est le Poly[vinyl(pyridinium chlorochromate)], comme indiqué par FRECHET J.M., WARNOCK J., et FARRALL J., J Org. Chem, vol 43, N°13, p2618-21 (1978).

15 D'autres caractéristiques, buts et avantages de l'invention apparaissent à la lecture des exemples qui suivent donnés à titre non limitatifs, et des figures annexées dans lesquelles :

- les figures 1 à 6 sont des graphes représentant les résultats obtenus à l'exemple 10,
- 20 - la figure 7 représente quatre graphes illustrant les résultats obtenus à l'exemple 11,
- la figure 8 représente un graphe illustrant les résultats obtenus à l'exemple 12,
- la figure 9 représente un graphe illustrant les résultats obtenus à l'exemple 13,
- 25 - les figures 10a, 10b et 10c illustrent les résultats obtenus à l'exemple 14.

EXEMPLE 1 : Fabrication du 3-méthyl-3-butène-1-yl-méthylènediphosphonate (IPCP) :

30 Préparation du 3-méthyl-3-butène-1-yl -tosylate

Dans un réacteur en verre équipé pour la manipulation sous atmosphère inerte et soigneusement séché, sont introduits sous agitation magnétique

(2,32 mmoles - 442mg) de chlorure de tosylo et (2,55 mmoles - 312 mg) de 4-(N,N-diméthylamino)pyridine dans 5 ml de dichlorométhane anhydre. A ce mélange, on ajoute lentement à l'aide d'une seringue et par l'intermédiaire d'un septum (2,32 mmoles - 200 mg) d'isopenténol en solution dans environ 1ml de dichlorométhane. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince de silice (gel de silice 60 F-254 - éluant : pentane/acétate d'éthyle 85/15 v/v -  $R_f(R-OTs) = 0,4$  et  $R_f(TsCl) = 0,5$ ). Après environ 3 heures d'agitation sous atmosphère d'azote on dilue le mélange réactionnel dans un grand volume d'hexane (environ 100ml) ce qui entraîne la formation immédiate d'un précipité blanc. Le mélange est ensuite filtré et le filtrat concentré par évaporation sous pression réduite. La solution est diluée avec un peu de diéthyl éther et filtrée à nouveau. Après évaporation du solvant, on obtient une huile jaunâtre. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne préparative de silice (gel de silice 60 - éluant : pentane/acétate d'éthyle 85/15). (1,98 mmoles - 475 mg) de 3-méthyl-3-butène-1-yl -tosylate (85 % de rendement en produit isolé) sont ainsi obtenus. Le composé (huile incolore) est stocké à + 4°C en milieu anhydre.

Préparation du tris(tetra-n-butylammonium) hydrogène-méthylènediphosphonate :

On prépare une solution contenant (5,68 mmoles - 1g) d'acide méthylènediphosphonique dans environ 20 ml d'eau déionisée. A cette solution acide (pH 1.0), on ajoute goutte à goutte une solution aqueuse d'hydroxyde de tétra-n-butylammonium ( $Bu_4NOH$ ) à 40% en masse jusqu'à obtenir une valeur de pH égale à 10.0. Après lyophilisation de la solution titrée, on obtient environ 5 g de sel de tétra-n-butylammonium (solide hygroscopique d'aspect huileux) que l'on dissout dans 10 ml d'acétonitrile anhydre. La solution saline est ensuite filtrée puis séchée par évaporations successives du solvant sous pression réduite. On obtient ainsi une solution de tris(tétra-n-butylammonium) hydrogène-méthylènediphosphonate avec une pureté égale à 97 % (résultat déduit de l'analyse par chromatographie ionique - HPAEC). Le volume est ajusté avec de l'acétonitrile anhydre afin d'obtenir une concentration en sel comprise entre 0,5 et 1M. La solution est stockée à -20 °C en milieu anhydre.

Préparation du 3-méthyl-3-butène-1-yl-méthylènediphosphonate (isopentényl méthylènediphosphonate) :

Dans un réacteur en verre soigneusement séché, on introduit sous atmosphère d'azote 2,5 ml d'une solution de tris(tétra-n-butylammonium) hydrogène-méthylènediphosphonate à 0,7 M (1,75 mmoles) dans l'acétonitrile anhydre. Le réacteur est refroidi par un bain de glace puis on ajoute sous agitation magnétique et à l'aide d'une seringue (0,70 mmoles - 168 mg) de 3-méthyl-3-butène-1-yl -tosylate en solution dans un minimum d'acétonitrile (0,5 - 1M). Après introduction du tosylate, le bain de glace est retiré puis la réaction est laissée sous agitation à température ambiante. L'avancement de la réaction est alors suivi par chromatographie ionique (HPAEC) sur colonne IonPac® AS11. Après environ 3 heures, le solvant est évaporé sous pression réduite et le milieu réactionnel redissout dans 3 ml d'un mélange eau /2-propanol 98/2 (v/v). La solution est passée sur une colonne contenant (19 mequiv - 4 g) de résine cationique DOWEX® 50-WX8-200 (forme  $\text{NH}_4^+$ ) puis éluée avec 10 ml du mélange eau (pH 9)/2-propanol 98/2 (v/v). Après lyophilisation, on recueille un solide blanc contenant le produit brut.

#### Purification :

Le diphosphonate d'ammonium en excès et une faible proportion de sels inorganiques sont séparés du milieu réactionnel par co-précipitation en présence d'hydrogénocarbonate d'ammonium. On dissout le produit brut obtenu à l'étape précédente dans 4 ml d'hydrogénocarbonate d'ammonium 0,1 M que l'on transfère dans un tube à centrifugation de 25 ml. On traite alors la solution avec 10 ml d'un mélange acétonitrile/2-propanol 1/1 (v/v) en agitant vigoureusement le mélange (vortex) pendant quelques minutes jusqu'à formation d'un précipité. Le tube est ensuite centrifugé à 2000 tr/min à 10 °C pendant 5 minutes. Le surnageant, dans lequel sont extraits les sels organiques, est conservé à +4°C. La procédure est renouvelée en redissolvant le précipité dans 3ml d'hydrogénocarbonate d'ammonium 0,1 M auxquels on ajoute 7 ml du mélange acétonitrile/2-propanol. Après élimination du solvant de l'ensemble des surnageants dans un évaporateur rotatif, on obtient un liquide huileux que l'on conserve à +4°C.

Le tosylate d'ammonium est en majeure partie séparé du milieu réactionnel par extraction avec le solvant chloroforme/méthanol 1/1 (v/v). Le

liquide huileux de l'étape précédente est dissout dans 4 ml d'eau déionisé à pH 9 et traité avec 1 ml de ce solvant par une procédure classique d'extraction répétée 3 fois. On élimine ensuite de la phase aqueuse les traces de solvant par évaporation sous pression réduite à 30 °C. La solution est stockée à -20 °C.

5 Le produit est purifié ultérieurement selon les besoins par chromatographie d'échange d'anions sur cartouches Sep-Pak Accell Plus QMA (Waters®) de 360 mg à 10 grammes éluées successivement par des solutions aqueuses d'hydrogencarbonate d'ammonium respectivement de 20 mM, 40 mM, 100 mM, puis 200 mM avec suivi chromatographique (HPAEC) des fractions  
10 éluées. Les fractions correspondant au produit purifié sont regroupées puis lyophilisées. Pour la mise en œuvre de tests biologiques les solutions aqueuses du produit sont stérilisées par filtration sur filtre de 0,2 µm et stockées à -20 °C. Dans le cas de tests réalisés in vivo, les solutions sont préalablement passées sur une colonne de résine cationique DOWEX® 50-WX8-200 (forme Na<sup>+</sup>) éluee par deux  
15 volumes de colonne d'eau déionisée.

Analyse du sel d'ammonium par spectrométrie de masse à ionisation dite par "électrospray" (mode négatif) :

ESI-MS :  $m/z = 243$  [M-H]<sup>-</sup> espèce pseudomoléculaire

ESI-MS/MS de l'ion [M-H]<sup>-</sup> :  $m/z = 225$  (perte d'H<sub>2</sub>O);  $m/z =$   
20 157 (pyrophosphate)

EXEMPLE 2 : Fabrication du 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-méthylènediphosphate (BrHPCP) :

0,34 mmoles (100 mg) de 3-méthyl-3-butène-1-yl-méthylènediphosphate (sel d'ammonium) en solution dans 2 ml d'eau déionisée  
25 de pH neutre sont traitées sous une hotte aspirante par 1,9 ml d'une solution aqueuse saturée (0,18 M) d'eau de brome (1 équivalent - 0,34 mmoles de brome). L'eau de brome est ajoutée progressivement et de préférence sur une solution froide du sel d'ammonium en agitant périodiquement jusqu'à décoloration de l'eau de brome. Dans le cas où le brome est ajouté en léger excès (coloration jaune  
30 persistante), la solution est transférée dans un ballon en verre puis placée quelques minutes sous pression réduite (évaporateur rotatif) à une température de 30 °C jusqu'à disparition de la coloration. Le produit 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-

méthylènediphosphonate est généré quantitativement (0,33 mmoles - 130 mg) - résultat déduit de l'analyse par chromatographie ionique - HPAEC. La solution est ensuite traitée comme dans l'exemple 1 pour la mise en œuvre de tests biologiques et stockée à -20 °C.

- 5 Analyse du sel d'ammonium par spectrométrie de masse à ionisation dite par "électrospray" (mode négatif) :

ESI-MS :  $m/z = 339, 341$  isotopes naturels du brome présent dans l'espèce pseudomoléculaire  $[M-H]^-$

- ESI-MS/MS de l'ion  $[M-H]^-$  :  $m/z = 259$  (réarrangement  
10 intramoléculaire)

EXEMPLE 3 : Fabrication du 3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl-méthylènediphosphonate (IHPCP) :

Préparation de l'eau iodée :

- Une solution d'eau iodée de l'ordre de 0,5 à 1 mM est  
15 préparée par sonication prolongée (15 minutes environ) de quelques cristaux d'iode dans une solution d'eau déionisée et filtration. Pour des essais portant sur de plus grandes quantités, des solutions plus concentrées en iode peuvent être obtenues en rajoutant une faible proportion d'alcool à la solution aqueuse initiale. L'eau iodée est ensuite titrée par le thiosulfate de sodium avec de l'empois d'amidon comme  
20 indicateur coloré.

Préparation du 3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl-méthylène-  
diphosphonate :

- 5  $\mu$ moles (1 ml d'une solution à 5 mM) de 3-méthyl-3-butène-1-yl-méthylènediphosphonate préparé selon l'exemple 1 sous forme de sel  
25 d'ammonium en milieu aqueux ou hydroalcoolique de pH neutre sont traitée à température ambiante par ajout de 1 équivalent d'iode en solution aqueuse (5 ml d'eau iodée à 1 mM). La solution est placée 30 minutes à température ambiante, puis 30 minutes à +4 °C en effectuant périodiquement une agitation vigoureuse. Après décoloration de l'eau iodée, le produit 3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl-  
30 méthylènediphosphonate est généré quantitativement. Pour la mise en œuvre de tests biologiques, la solution est préalablement concentrée par lyophilisation et traitée comme dans l'exemple 1.

**EXEMPLE 4** : Fabrication du 3,4-époxy-3-méthyl-1-butyl-méthylènediphosphonate (Epoxy PCP) :

On traite à température ambiante, 1 ml d'une solution aqueuse contenant (2 mg - 5,1  $\mu$ moles) de 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-méthylènediphosphonate (sel d'ammonium) préparé selon l'exemple 2, avec 0,5 ml  
5 d'une solution molaire d'ammoniaque. La solution est maintenue sous agitation pendant quelques minutes puis lyophilisée pour éliminer l'ammoniaque. Le résidu sec obtenu après lyophilisation est redissout dans 1 ml d'eau déionisée et purifié par chromatographie d'échange d'anions sur cartouches Sep-Pak Accell Plus QMA  
10 (Waters®) de 360 mg comme décrit dans l'exemple 1.

Analyse du sel d'ammonium par spectrométrie de masse à ionisation dite par "électrospray" (mode négatif) :

ESI-MS :  $m/z = 259$   $[M-H]^-$  espèce pseudomoléculaire

ESI-MS/MS de l'ion  $[M-H]^-$  :  $m/z = 241$  (perte d' $H_2O$ ) ;  $m/z =$   
15 157 (pyrophosphonate)

**EXEMPLE 5** : Fabrication du 3-méthyl-3-butanol-1-yl-méthylènediphosphonate (tButOHPCP) :

Selon une procédure analogue à celle décrite dans l'exemple 1, on prépare dans une première étape le 3-méthyl-3-butanol-1-yl-tosylate à partir  
20 de 3-méthyl-1,3-butanediol. Le 3-méthyl-3-butanol-1-yl-méthylènediphosphonate est obtenu en faisant réagir 0,5 mmole de tosylate et 1 mmole de tris(tetra-n-butylammonium) hydrogène-méthylènediphosphonate à température ambiante pendant 24 heures. La procédure de purification est identique à celle décrite dans l'exemple 1.

25 Analyse du sel d'ammonium par spectrométrie de masse à ionisation dite par "électrospray" (mode négatif) :

ESI-MS :  $m/z = 261$   $[M-H]^-$  espèce pseudomoléculaire

ESI-MS/MS de l'ion  $[M-H]^-$  :  $m/z = 243$  (perte d' $H_2O$ ) ;  $m/z =$   
157 (pyrophosphonate)

30 **EXEMPLE 6** : Fabrication du 3-méthyl-3,4-butanediol-1-yl-méthylènediphosphonate (Diol PCP) :

Dans une fiole en verre, on introduit 1 ml d'une solution aqueuse de pH neutre du sel d'ammonium du 3-méthyl-3-butène-1-yl-méthylènediphosphonate (3,4  $\mu$ moles - 1 mg) - préparé selon l'exemple 1 - A cette solution sont ajoutés en plusieurs fractions, 680  $\mu$ l d'une solution froide de permanganate de potassium à 5 mM (1 équivalent - 3,4  $\mu$ moles) en agitant  
5 périodiquement la solution que l'on place en chambre froide (+4°C). Après environ 40 minutes de réaction pendant lesquelles il s'est formé un précipité marron de dioxyde de manganèse, on ajoute quelques microlitres d'une solution aqueuse saturée d'isopenténol. Le dioxyde de manganèse est séparé du mélange réactionnel  
10 par centrifugation puis filtration. Le filtrat est purifié par chromatographie d'échange d'anions sur cartouches Sep-Pak Accell Plus QMA (Waters®) de 360 mg comme décrit dans l'exemple 1.

**EXEMPLE 7** : Fabrication du 3-méthyl-3-butène-1-yl-difluorométhylènediphosphonate (IPCF<sub>2</sub>P) :

15 Ce produit est préparé comme décrit dans l'exemple 1, en faisant réagir dans l'acétonitrile anhydre, 0,5 mmole de 3-méthyl-3-butène-1-yl-tosylate avec (3 équivalents - 1,5 mmoles) du sel de tris(tetra-n-butylammonium) hydrogène-difluorométhylènediphosphonate préparé selon le protocole décrit par V.Jo Davisson *et al.* J. Org. Chem., 1986, 51 p 4768-4779.

20 Analyse du sel d'ammonium par spectrométrie de masse à ionisation dite par "électrospray" (mode négatif) :

ESI-MS :  $m/z = 279$  [M-H]<sup>-</sup> espèce pseudomoléculaire

ESI-MS/MS de l'ion [M-H]<sup>-</sup> :  $m/z = 261$  (perte d'H<sub>2</sub>O) ;  $m/z = 193$  (pyrophosphonate)

25 **EXEMPLE 8** : Fabrication du 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-difluorométhylènediphosphonate (BrHPCF<sub>2</sub>P) :

Ce produit est obtenu par réaction du 3-méthyl-3-butène-1-yl-difluorométhylènediphosphonate (préparé selon l'exemple 7) avec l'eau de brome en suivant la procédure décrite dans l'exemple 2.

30 Analyse du sel d'ammonium par spectrométrie de masse à ionisation dite par "électrospray" (mode négatif) :



ESI-MS :  $m/z = 375, 377$  isotopes naturels du brome présent dans l'espèce pseudomoléculaire  $[M-H]^-$

ESI-MS/MS de l'ion  $[M-H]^-$  :  $m/z = 295$  (réarrangement intramoléculaire)

5                    EXEMPLE 9 : Fabrication du 3,4-époxy-3-méthyl-1-butyl-difluorométhylènediphosphonate (Epoxy PCF<sub>2</sub>P) :

Ce produit est obtenu par traitement en milieu basique du 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-difluorométhylènediphosphonate (préparé selon l'exemple 8) en suivant la procédure décrite dans l'exemple 4.

10                    Analyse du sel d'ammonium par spectrométrie de masse à ionisation dite par "électrospray" (mode négatif) :

ESI-MS :  $m/z = 295$   $[M-H]^-$  espèce pseudomoléculaire

ESI-MS/MS de l'ion  $[M-H]^-$  :  $m/z = 277$  (perte d'H<sub>2</sub>O) ;  $m/z = 193$  (difluorométhylènediphosphonate)

15                    EXEMPLE 10 : Mesure de l'activité cytotoxique d'un clone Ty982 activé par 80nM de BrHPP, ou non activé :

On compare l'activité cytotoxique spécifique d'un clone de lymphocytes Ty982 mesurée selon le test de cytotoxicité induite, cette activité étant stimulée avec 80nM de l'antigène 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-diphosphate (BrHPP) (petits points noirs en haut à gauche de la figure 1), et considérée comme la réponse de référence (100%), par rapport à celle d'une culture de clones non stimulés (0%) (petits points blancs figure 1).

Les courbes de la figure 1 représentent le pourcentage de réponse résiduelle (test de cytotoxicité induite) obtenu dans des cultures stimulées par 80nM de BrHPP en présence de différentes concentrations (en abscisses) des composés selon l'invention, à savoir BrHPCHFP (triangles blancs), IHPCP (triangles noirs), Diol PCP (ronds noirs), Epoxy PCP (carrés gris et croix), tButOHPCP (carrés noirs), et IPCP (carrés blancs), tels qu'obtenus aux exemples précédents.

30                    On constate que l'ajout de concentrations croissantes de ces composés inhibe jusqu'à 100% de la réponse de référence.

Les essais effectués comme indiqué ci-dessus sur différents composés selon l'invention permettent de définir leurs concentrations IC<sub>50</sub>, exprimées en micromolaire dans le tableau suivant, conduisant à l'inhibition de 50% de la réponse de référence des lymphocytes stimulés par 80nM du composé BrHPP selon le test de cytotoxicité induite.

Composé	$\mu\text{M}$
I PCP	700
tButOH PCP	1000
Epoxy PCP	30
BrH PCP	15
IH PCP	15
I PCF <sub>2</sub> P	1000
Epoxy PCF <sub>2</sub> P	300
BrH PCF <sub>2</sub> P	150

D'autres essais semblables ont aussi été effectués avec les composés analogues monofluorés (où le groupement R<sub>2</sub> est le monofluorométhylènediphosphonate) BrHPCHF<sub>2</sub>P et Epoxy PCHF<sub>2</sub>P. Ces composés sont bioactifs (c'est-à-dire inhibent sélectivement les lymphocytes Ty982), avec une bioactivité de 30 $\mu\text{M}$  pour BrHPCHF<sub>2</sub>P et de 50 $\mu\text{M}$  pour Epoxy PCHF<sub>2</sub>P, pour une concentration de BrHPP égale à 150 $\mu\text{M}$ .

Les figures 2 et 3 sont des graphes semblables à la figure 1 obtenus en remplaçant l'antigène BrHPP par l'antigène IPP (isopenténylpyrophosphate) à 325 $\mu\text{M}$  ou, respectivement, à 162  $\mu\text{M}$ . Les composés selon l'invention utilisés étaient dans ces exemples IPCP (carrés noirs), BrHPCP (triangles blancs) et IHPCP (triangles noirs). Comme on le voit, l'inhibition par les composés selon l'invention ne dépend pas de l'antigène utilisé pour stimuler les lymphocytes Ty982.

Les figures 4 à 6 illustrent les résultats obtenus avec ces mêmes trois composés selon l'invention mais en utilisant comme antigène stimulant les lymphocytes Ty982, le composé BrHPP à une concentration variant, respectivement, de 150 $\mu\text{M}$ , 75 $\mu\text{M}$  et 37 $\mu\text{M}$ . Comme on le voit, les composés selon

l'invention produisent l'inhibition des lymphocytes dans tous les cas, mais à des concentrations qui varient dans le même sens que les concentrations d'antigène de stimulation utilisées. Autrement dit, plus la concentration d'antigène stimulant est forte, plus la concentration de composé selon l'invention nécessaire pour inhiber les lymphocytes doit aussi être forte.

EXEMPLE 11 : Mesure de l'activité inhibitrice et de son caractère réversible, par le test de cytotoxicité induite et le test de relargage de TNF :

La figure 7 représente quatre graphes illustrant l'inhibition par le composé selon l'invention BrHPCP et la restauration de l'activité antigénique stimulante du BrHPP.

Les deux graphes de gauche sont obtenus en stimulant les lymphocytes Ty982 comme à l'exemple 12 en ajoutant tout d'abord 9nM de l'antigène BrHPP dans le milieu de culture, puis en ajoutant des concentrations croissantes (en abscisses) du composé selon l'invention BrHPCP. Les deux graphes de droite sont obtenus en incorporant tout d'abord 60µM du composé selon l'invention BrHPCP dans le milieu de culture au contact des lymphocytes Ty982 puis en ajoutant des concentrations croissantes (en abscisses) du composé antigénique stimulant BrHPP. Les valeurs obtenues sont représentée par des ronds noirs. Les ronds blancs donnent les valeurs obtenues en l'absence du composé initial (BrHPP sur les graphes de gauche, BrHPCP sur les graphes de droite). Les graphes du haut fournissent le pourcentage de réponse résiduelle dans les cultures (test de cytotoxicité induite). Les graphes du bas fournissent la concentration de TNF relarguée en pg/ml.

Comme on le voit, le composé selon l'invention BrHPCP inhibe la stimulation par BrHPP, mais cette inhibition est réversible dans la mesure où, après inhibition par le composé selon l'invention BrHPCP, la stimulation est restaurée par ajout de BrHPP.

Ce caractère réversible de l'inhibition des lymphocytes Ty982 par les composés selon l'invention est important du point de vue thérapeutique. En effet, suite à un traitement d'une activation massive à caractère pathogène des

lymphocytes Ty982 grâce à un composé selon l'invention (par exemple lors d'un accès de paludisme ou sur une tumeur), le système immunitaire du patient n'est pas pour autant définitivement dégradé et ensuite, peut être rapidement restauré.

**EXEMPLE 12 :** BrHPCP n'est pas inhibiteur des lymphocytes

5 Ty883 :

Un test de cytotoxicité induite est réalisé comme dans l'exemple 12, mais avec un clone de lymphocyte Ty883 stimulé par un antigène traditionnel de ces lymphocytes (ronds noirs), et en présence du composé selon l'invention BrHPCP en concentrations croissantes dans le milieu de culture (carrés  
10 noirs sur la figure 8). Comme on le voit figure 8, le composé selon l'invention n'inhibe pas les lymphocytes Ty883. Il est donc un inhibiteur spécifique des lymphocytes Ty982.

**EXEMPLE 13 :**

Dans cet exemple, on réalise un test de cytotoxicité induite sur  
15 des cellules cibles P815 par un clone de lymphocytes Ty982 stimulé soit par la phytohémataglutinine A (PHA), qui est un stimulant non spécifique et non phosphaté des lymphocytes Ty982, à 70 ng/ml et à 24 ng/ml, soit par l'antigène BrHPP à 80nM. Le stimulant est utilisé seul (barres blanches figure 9) soit en présence du composé inhibiteur selon l'invention BrHPCP à 70μM (barres noires figure 9).

20 Comme on le voit, le composé selon l'invention n'inhibe pas les lymphocytes activés par le stimulant non spécifique PHA. Il n'inhibe donc les lymphocytes Ty982 que s'ils ont été préalablement stimulés de façon spécifique par un antigène diphosphaté (phosphoantigène) tel que BrHPP.

**EXEMPLE 14 :**

25 Un million de lymphocytes Ty982 sont déposés dans un puits de 10μl d'un microphysiomètre (appareil CYTOSENSOR ® commercialisé par MOLECULAR DEVICES, USA). Leur vitesse de métabolisme donnée par l'appareil est mesurée toutes les 30 secondes. On ajoute dans le puits une composition comprenant soit l'antigène BrHPP à 0, 2, 10 et 100nM (figure 10a), soit  
30 BrHPCP - à 2, 10, 100μM (ronds, carrés et triangles blancs figure 10b), soit l'antigène IHPP (3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl-diphosphate) à 10nM (ronds noirs

figure 10b), en tant que référence, soit une composition de contrôle inactive (ronds blancs figure 10c), soit BrHPCP à 50 $\mu$ M seul (carrés blancs figure 10c), soit IPP (isopenténylpyrophosphate) seul à 30 $\mu$ M (ronds noirs figure 10c), soit IPP à 30 $\mu$ M et BrHPCP à 50 $\mu$ M (triangles blancs figure 10c).

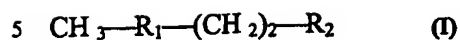
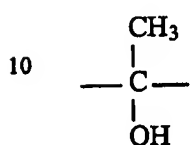
5 L'instant d'adjonction des compositions est représenté par la flèche sur les figures 10a, 10b, 10c.

Comme on le voit, comparativement à la réponse détectée dès l'addition des antigènes, les composés selon l'invention n'induisent pas de réponse (figure 10b) et diminuent la réponse aux phosphoantigènes (figure 10c) des  
10 lymphocytes Ty982.

Le suivi de l'expérience de la figure 10c sur une durée plus grande révèle également que la durée pendant laquelle les lymphocytes Ty982 sont activés est aussi diminuée en présence des composés selon l'invention.

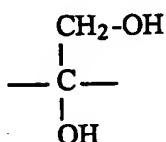
## REVENDICATIONS

1/- Nouveaux composés de formule :

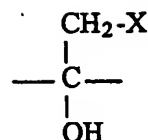
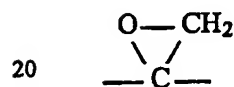
où  $\text{R}_1$  est choisi parmi les fonctions suivantes :

alcool tertiaire

15

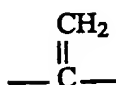


1,2-diol

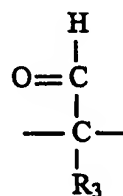
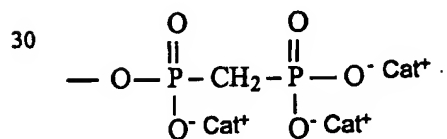
halohydrine, X étant un  
halogène choisi parmi Cl, Br, I

époxyde

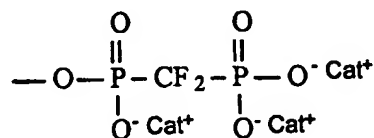
25



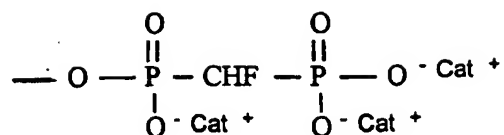
alcène

aldéhyde ( $\text{R}_3$  étant un  
hydrogène H)  
 $\alpha$ -hydroxyaldéhyde ( $\text{R}_3$  étant  
un hydroxyle OH)et  $\text{R}_2$  est choisi parmi l'un des groupements suivants :

méthylènediphosphonate



difluorométhylènediphosphonate



5

## monofluorométhylènediphosphonate

où Cat<sup>+</sup> représente un (ou des) cation(s) organique(s) ou minéral(aux) (y compris le proton) identiques ou différents dans le même composé,

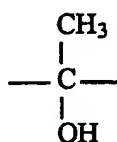
à l'exception du 3-méthyl-3-butène-1-yl-difluorométhylènediphosphonate, et du  
10 3-méthyl-3-butène-1-yl-méthylènediphosphonate.

## 2/ - Composés de formule :



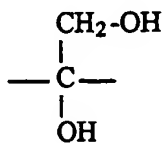
où R<sub>1</sub> est choisi parmi les fonctions suivantes :

15

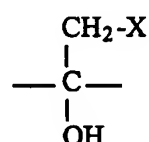


alcool tertiaire

20

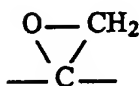


1,2-diol

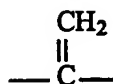


halohydrine, X étant un halogène  
choisi parmi Cl, Br, I

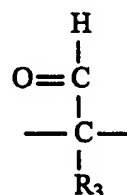
25



époxyde



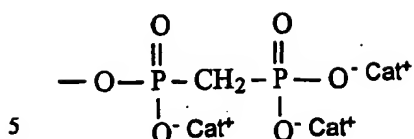
alcène



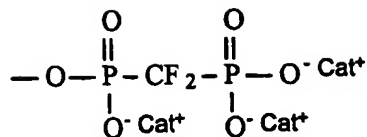
aldéhyde (R<sub>3</sub> étant un  
hydrogène H )  
α-hydroxyaldéhyde (R<sub>3</sub> étant un  
hydroxyle OH )

30

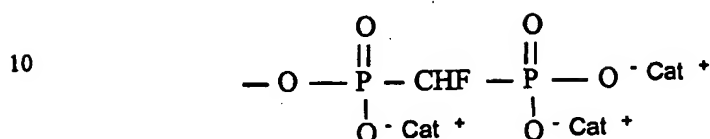
et R<sub>2</sub> est choisi parmi l'un des groupements suivants :



méthylènediphosphonate



difluorométhylènediphosphonate



monofluorométhylènediphosphonate

où Cat<sup>+</sup> représente un (ou des) cation(s) organique(s) ou minéral(aux) (y compris le proton) identiques ou différents dans le même composé,  
pour leurs utilisations comme agents d'inhibition sélective des lymphocytes Ty982.

3/ - Composés selon l'une des revendications 1 ou 2 pour leur utilisation à titre de substances thérapeutiquement actives.

4/ - Composés selon l'une des revendications 1 ou 2 pour leur utilisation dans une composition thérapeutique destinée à être administrée à un primate en vue du traitement préventif ou curatif d'une pathologie impliquant l'activation des lymphocytes Ty982.

5/ - Composition thérapeutique ou de diagnostic, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un composé selon l'une des revendications 1 ou 2.

6/ - Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité apte à être administrée à un primate -notamment au contact du sang périphérique ou par voie topique- d'au moins un composé selon l'une des revendications 1 ou 2.

7/ - Procédé de fabrication d'une composition ayant la propriété d'inhiber sélectivement les lymphocytes Ty982 dans lequel on utilise au moins un composé selon l'une des revendications 1 ou 2.

8/ - Procédé de fabrication d'une composition thérapeutique destinée au traitement préventif ou curatif d'une pathologie induisant une activation



des lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2 dans lequel on utilise au moins un composé selon l'une des revendications 1 ou 2.

9/ - Procédé de fabrication d'une composition thérapeutique destinée à être administrée à un primate -notamment au contact du sang  
5 périphérique ou par voie topique- pour le traitement préventif ou curatif d'une pathologie induisant une activation des lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2 dans lequel on utilise au moins un composé selon l'une des revendications 1 ou 2.

10/ - Procédé de fabrication d'une composition thérapeutique destinée à être administrée à un primate pour le traitement préventif ou curatif des  
10 parasitoses appartenant au groupe formé de la malaria, de la leishmaniose viscérale, et de la toxoplasmose, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'une des revendications 1 ou 2.

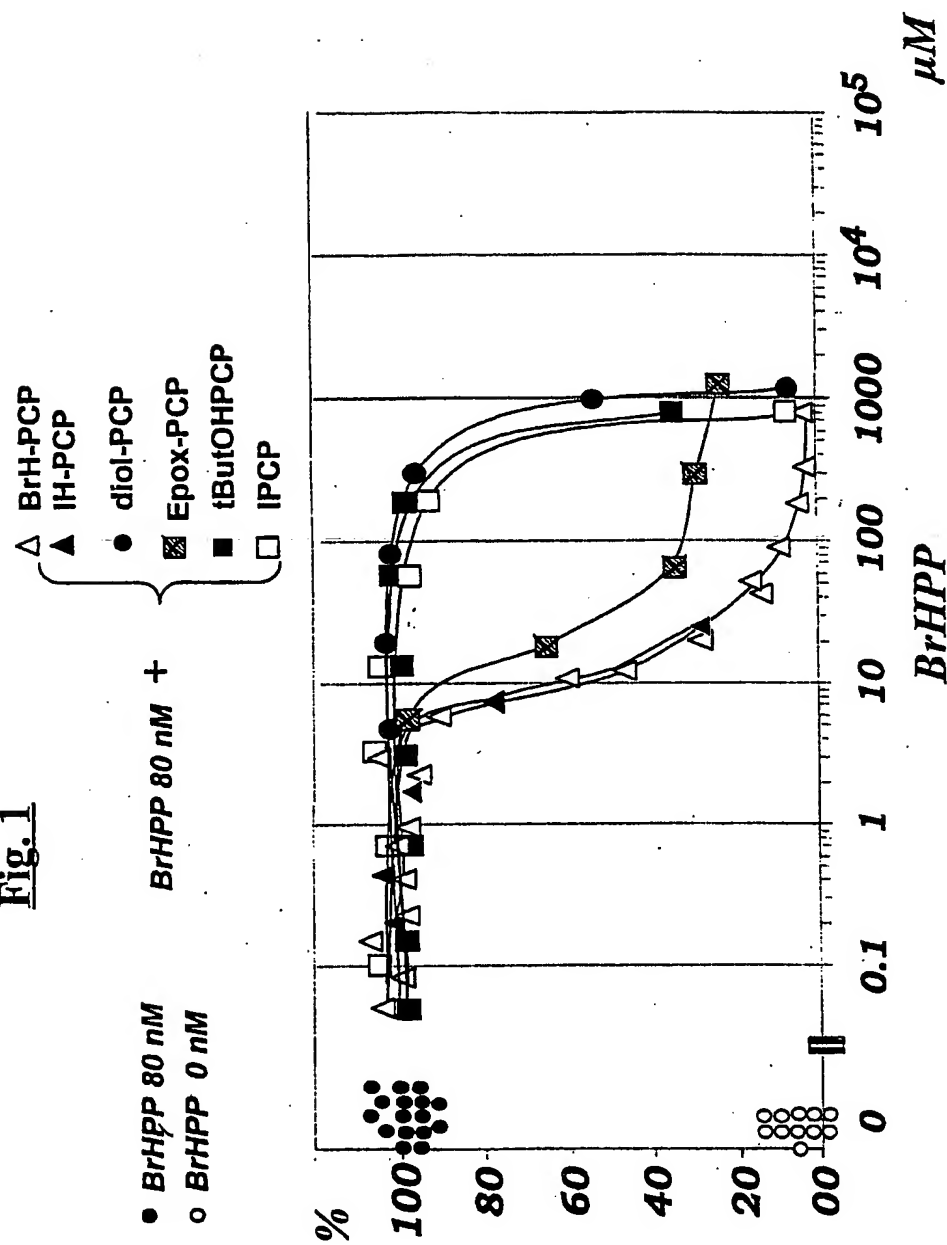
11/ - Procédé de fabrication d'une composition thérapeutique destinée à être administrée à un primate pour le traitement préventif ou curatif d'une  
15 maladie auto-immune -notamment choisie parmi la sclérose en plaques et la maladie de Behçet- impliquant une activation des lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2 dans lequel on utilise au moins un composé selon l'une des revendications 1 ou 2.

12/ - Procédé de fabrication d'une composition thérapeutique destinée à être administrée à un primate pour le traitement préventif ou curatif d'une  
20 pathologie bactérienne appartenant au groupe formé de la brucellose, de la tularémie, des salmonelloses, des tuberculoses, et de l'ehrlichiose, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'une des revendications 1 ou 2.

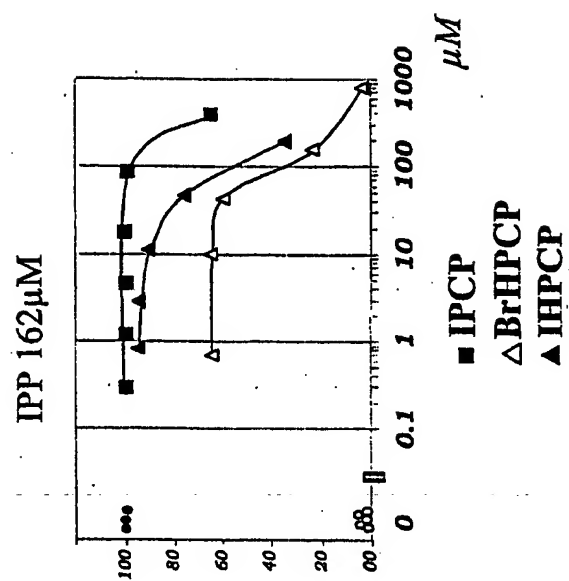
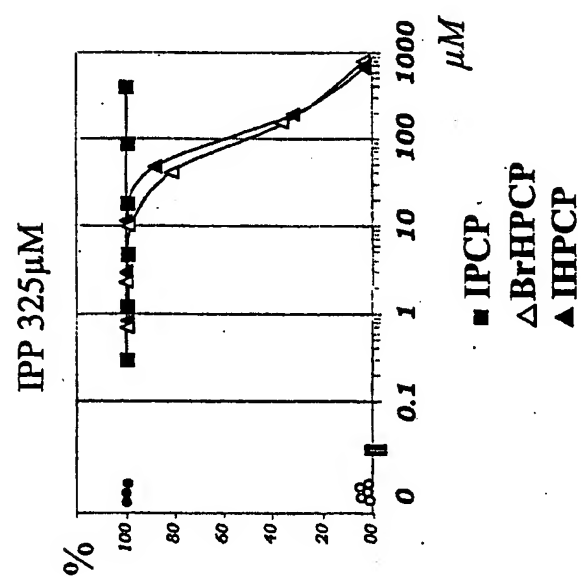
13/ - Procédé d'inhibition sélective de lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2 dans un milieu extracorporel dans lequel on met les lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2 au contact,  
25 dans ledit milieu extracorporel, avec au moins un composé selon l'une des revendications 1 ou 2.

14/ - Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'on utilise au moins un composé selon l'une des revendications 1 ou 2 à une concentration dans le milieu qui procure une inhibition de la prolifération  
30 polyclonale des lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2.

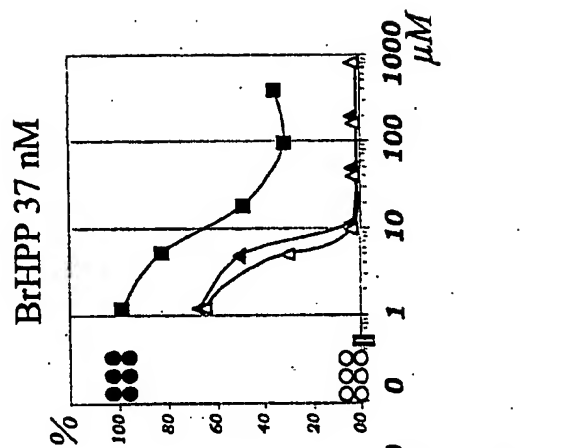
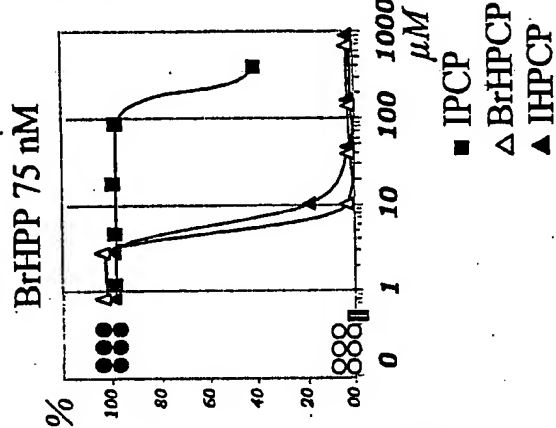
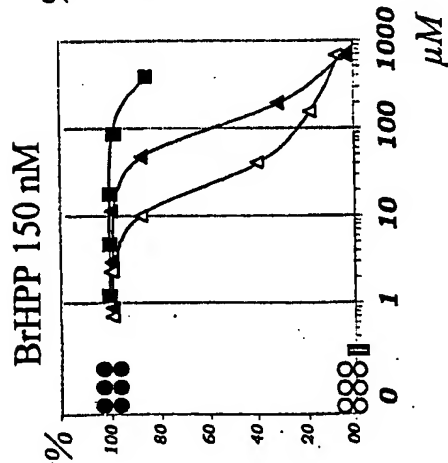
**Fig. 1**



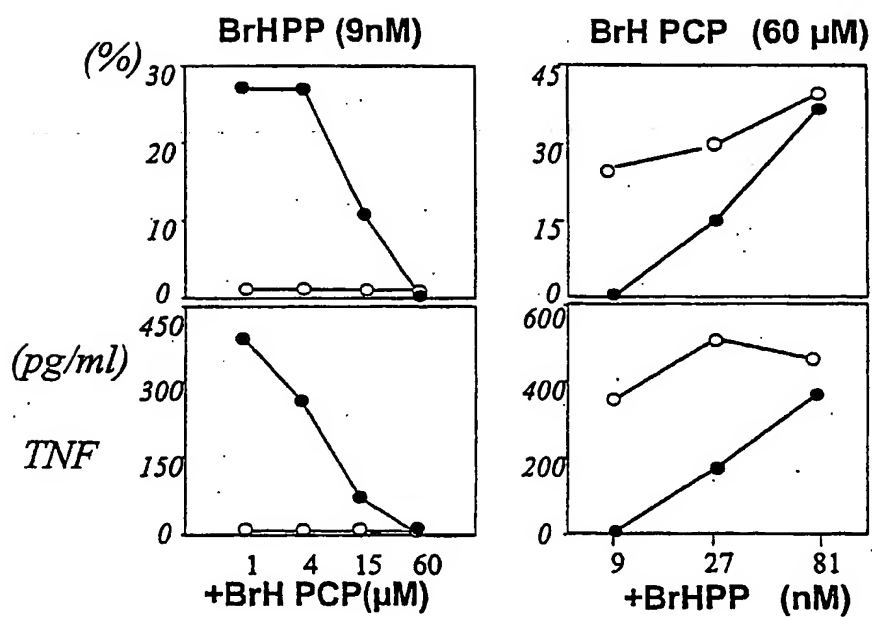
2/9

Fig.3Fig.2

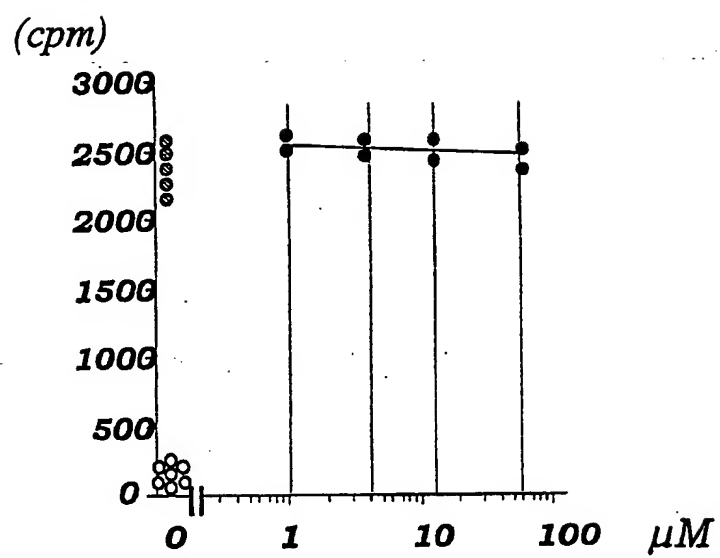
3/9

Fig.6Fig.5Fig.4

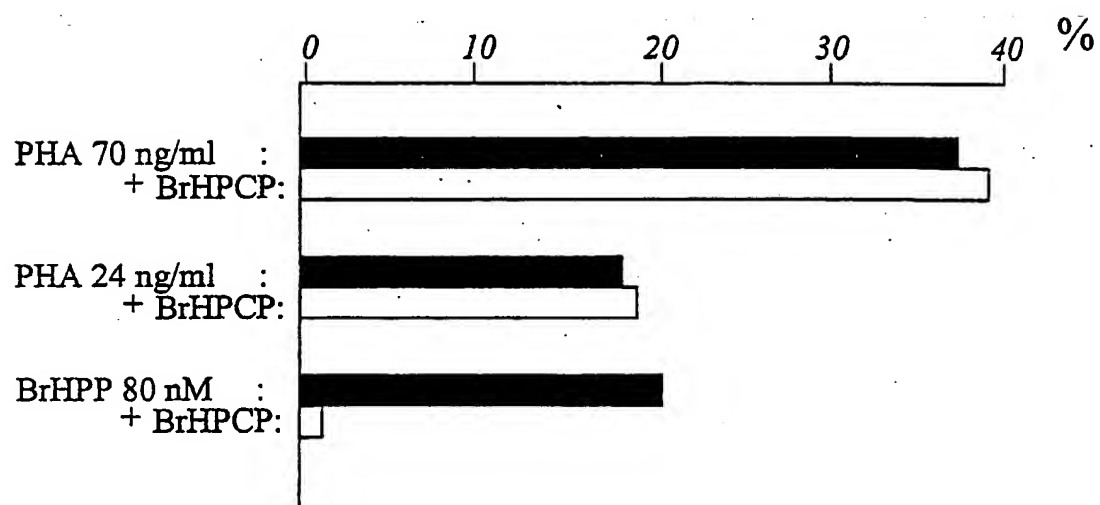
4/9

**Fig.7**

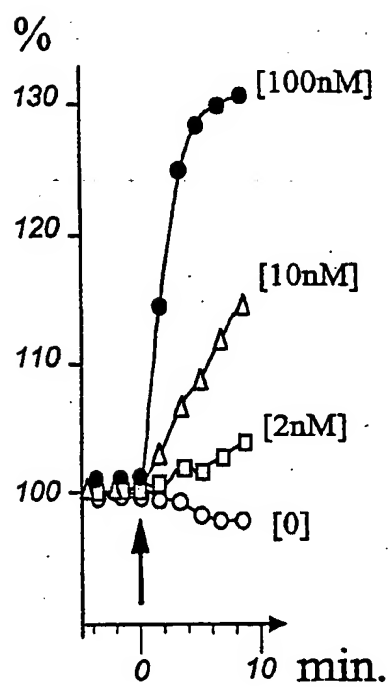
5/9

Fig.8

6/9

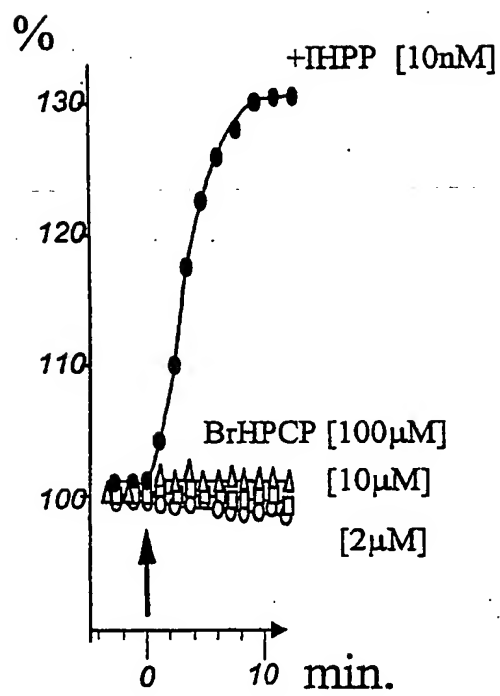
**Fig. 9**

7/9

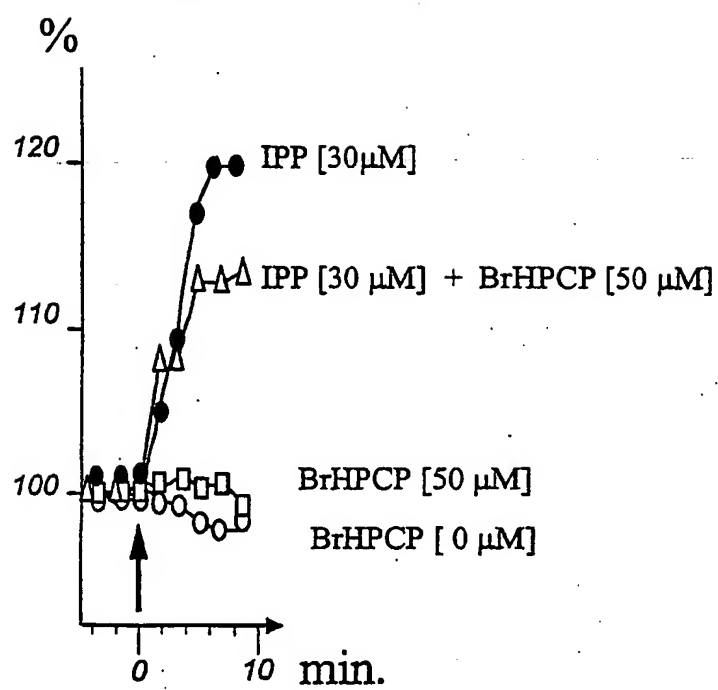
**Fig.10a**



8/9

**Fig.10b**

9/9

**Fig.10c**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00837

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07F9/40 A61K31/66 C07F9/655 C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07F A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 639 653 A (BARRY R. BLOOM) 17 June 1997 (1997-06-17) cited in the application the whole document	1-14
A	WO 95 20673 A (C.N.R.S.) 3 August 1995 (1995-08-03) cited in the application the whole document	1-14



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 June 2000

Date of mailing of the international search report

20/06/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Beslier, L

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00837

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHOEL B ET AL: "Phosphate is essential for stimulation of V.gamma.9V.delta.2 T lymphocytes by mycobacterial low molecular weight ligand" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 24, no. 8, 1994, pages 1886-1892, XP002102421 ISSN: 0014-2980 the whole document ---	1-14
X	GOTOH T ET AL: "Different roles of the diphosphate moieties of allylic and homoallylic diphosphates in the prenyltransferase reaction" BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (BBRCA9,0006291X);1988; VOL.156 (1); PP.396-402, XP002118543 Tohoku Univ.;Chem. Res. Inst. Non-Aqueous Solutions; Sendai; 980; Japan (JP) * page 397, schéma 1 * ---	1
A	V. JO DAVISSON: "Phosphorylation of isoprenoid alcohols" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY., vol. 51, no. 25, 1986, pages 4768-4779, XP002118544 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON., US ISSN: 0022-3263 cited in the application * page 4775, composé (22) * ---	1
P,Y	WO 00 12516 A (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) 9 March 2000 (2000-03-09) the whole document ---	1-14
P,Y	WO 00 12519 A (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) 9 March 2000 (2000-03-09) the whole document -----	1-14

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00837

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5639653	A	17-06-1997	US 5902793	A	11-05-1999
WO 9520673	A	03-08-1995	FR 2715660	A	04-08-1995
WO 0012516	A	09-03-2000	FR 2782721	A	03-03-2000
WO 0012519	A	09-03-2000	FR 2782722	A	03-03-2000

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem : Internationale No

PCT/FR 00/00837

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07F9/40 A61K31/66 C07F9/655 C12N5/06

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07F A61K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 639 653 A (BARRY R. BLOOM) 17 juin 1997 (1997-06-17) cité dans la demande le document en entier ---	1-14
A	WO 95 20673 A (C.N.R.S.) 3 août 1995 (1995-08-03) cité dans la demande le document en entier ---	1-14
	-/-	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 juin 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20/06/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Beslier, L

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den s Internationale No

PCT/FR 00/00837

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>SCHOEL B ET AL: "Phosphate is essential for stimulation of V.gamma.9V.delta.2 T lymphocytes by mycobacterial low molecular weight ligand"</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 24, no. 8, 1994, pages 1886-1892, XP002102421</p> <p>ISSN: 0014-2980</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p>	1-14
X	<p>GOTOH T ET AL: "Different roles of the diphosphate moieties of allylic and homoallylic diphosphates in the prenyltransferase reaction"</p> <p>BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (BBRCA9,0006291X);1988; VOL.156 (1); PP.396-402, XP002118543</p> <p>Tohoku Univ.;Chem. Res. Inst. Non-Aqueous Solutions; Sendai; 980; Japan (JP)</p> <p>* page 397, schéma 1 *</p> <p>---</p>	1
A	<p>V. JO DAVISSON: "Phosphorylation of isoprenoid alcohols"</p> <p>JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY., vol. 51, no. 25, 1986, pages 4768-4779, XP002118544</p> <p>AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON., US</p> <p>ISSN: 0022-3263</p> <p>cité dans la demande</p> <p>* page 4775, composé (22) *</p> <p>---</p>	1
P,Y	<p>WO 00 12516 A (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE)</p> <p>9 mars 2000 (2000-03-09)</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p>	1-14
P,Y	<p>WO 00 12519 A (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE)</p> <p>9 mars 2000 (2000-03-09)</p> <p>le document en entier</p> <p>-----</p>	1-14

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem » Internationale No

PCT/FR 00/00837

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5639653 A	17-06-1997	US 5902793 A	11-05-1999
WO 9520673 A	03-08-1995	FR 2715660 A	04-08-1995
WO 0012516 A	09-03-2000	FR 2782721 A	03-03-2000
WO 0012519 A	09-03-2000	FR 2782722 A	03-03-2000